动 物 学 研 究 2001, Aug. 22 (4): 269~274
Zoological Research
CN 53-1040/Q ISSN 0254-5853

TGF-β在小鼠胎盘中的表达

高 飞 马 捷 傅国强 魏 鹏 冯 强 刘以训[①]
(中国科学院动物研究所生殖生物学国家重点实验室 北京 100080)

摘要：利用原位杂交和免疫组化的方法对小鼠胎盘中的TGF-β (transform growth factor-β) mRNA和蛋白质进行检测，结果显示：在妊娠第7.5~9.5天，TGF-β主要在子宫蜕膜中表达，而且表达逐渐增强。说明这一时期TGF-β的作用主要是控制滋养层细胞的侵入，这种控制是通过对PA (plasminogenin activotor) 和MMP (matrix metalloproteinase) 两类主要的细胞外蛋白水解酶的抑制作用来实现的。到妊娠10.5天时，滋养层巨细胞明显表达TGF-β mRNA和蛋白质，这与其功能的转换是一致的。因为此时的滋养层巨细胞体积变大，停止增殖，其功能也从侵入型向内分泌型转换。海绵滋养层细胞从第9.5天开始表达TGF-β mRNA，而TGF-β抗原从第10.5天开始出现，第11.5~12.5天，TGF-β mRNA的表达达到最高，此时的TGF-β的作用是调控胎儿血管的形成。另外，TGF-β对免疫系统有强烈的抑制作用，妊娠中后期海绵滋养层细胞可能通过大量表达TGF-β以调节局部免疫，避免母体对胎儿的免疫排斥。

关键词：转化生长因子；小鼠；胎盘；滋养层细胞；海绵滋养层细胞；滋养层巨细胞
中图分类号：Q942 **文献标识码**：A **文章编号**：0254-5853(2001)04-0269-06

转化生长因子-β (TGF-β) 是一种多功能的 细胞因子，与细胞的生长、分化和免疫调节有着密

收稿日期：2001-01-16；修改稿收到日期：2001-03-07
基金项目：WHO/洛氏基金联合研究项目、"973"、"攀登"和"创新工程"项目
①联系人，电话：010-62588461，传真：010-62588461，E-mail：liuyx@panda.ioz.ac.cn

(上接第268页)

Phylogenetic Relationships among *Tetrahymena shanghaienisis* and two Strains of *Tetrahymena thermophila* Inferred from ITS-1 Sequences

MIAO Wei YU Yu-He SHEN Yun-Fen
(*Institute of Hydrobiology, the Chinese Academy of Sciences, Wuhan* 430072, *China*)

Abstract: Phylogenetic relationships among three strains of *Tetrahymena* (i.e. *T. shanghaienisis*, *T. thermophila* Ⅱ and *T. thermophila* Ⅵ) were investigated using sequences of the first internal transcribed spacer region (ITS-1) of ribosomal DNA (rDNA). Amplified rDNA sequences consisted of 221 bases of the flanking 18*S* and 5.8*S* regions, and the entire ITS-1 region (169 or 172 bases). There were 5 variable bases among three strains in the 18*S* region and 16 variable bases in the ITS-1 region. The affiliation of them were assessed using both Neighbor-joining (NJ) and maximum parsimony (MP) analyses. Variations do exist in the phylogenies created by the two methods. However, the basic tree topologies are consistent. In both the NJ and MP analyses, *T. shanghaienisis* diverge from the ancestor of *Tetrahymena* earlier than *T. thermophila* Ⅱ and *T. thermophila* Ⅵ, which show that the selfer might be primitive.

Key words: *Tetrahymena*; Phylogenetic relationships; ITS-1 region; Selfer; Mating type

切的关系(Lawrence,1996;Massague,1990)。许多正常组织都能产生 TGF－β,血小板和胎盘中尤其丰富(Assosian & Sporn,1986)。由于细胞类型和体内微环境不同,TGF－β 的作用也不相同。TGF－β 的正常表达可以促进或抑制生长,调节发育,参与炎症和组织修复过程(Moses & Serra,1996);而过量表达则具有破坏性,通常会导致胎儿在子宫内死亡或出生后立即死亡(Wahl,1994)。

小鼠胚胎从四细胞时期就开始表达 TGF－β;而胚泡阶段只有滋养外胚层表达，内细胞团未见表达 (Slager *et al*., 1991); 第 6.5 天系膜侧蜕膜表达 TGF－β (Manova, 1992); 此后，主要在蜕膜和子宫上皮中表达 TGF－β，胎盘、羊膜和卵黄囊均未见表达。蜕膜在第 5.5～9.5 天表达 TGF－β (Montuenga *et al*., 1998)。而小鼠胎盘形成中后期 TGF－β 的表达尚无系统研究报道，本实验运用原位杂交和免疫组化的方法对 TGF－βmRNA 和蛋白质在小鼠怀孕中后期胎盘中的表达和分布进行了研究，使人们对这种生长因子在胎盘形成过程中的作用有更全面的认识。

1 材料与方法

1.1 实验动物与试剂

昆明小白鼠由中国科学院遗传研究所实验动物中心提供。小鼠饲养于人工控制条件下(每天 12 h 光照),可自由引水、取食。以发现阴道栓的当日作为妊娠第 1 天。分别在妊娠第 7.5～14.5 天处死动物,收集胎盘,固定于福尔马林固定液中。组织以常规方法石蜡包埋,切片(6 μm),并贴附于 APES 预处理的载玻片上,作原位杂交和免疫组化。限制性内切酶 *Bam*H Ⅰ(R6021)、NBT、BCIP(S3771)均购自 Promega 公司;抗地高辛抗体(1098519)和阻断剂(1096176)购自 Boehringer 公司;TGF－β 多克隆抗体(sc－146)、碱性磷酸酶标记的二抗(ZB－2308)、正常山羊血清(ZLI－9020)均购自中山公司。

1.2 原位杂交

TGF－β 针参照 Liu *et al*. (1998) 的方法制备。原位杂交参照 Schaeren & Gerfin (1993) 的方法进行。

1.3 免疫组化

石蜡切片经二甲苯脱腊，然后经下行酒精复水，PBS 洗涤。切片在 3% 的 H_2O_2/60% 甲醇中温育 10 min，灭活内源性的辣根过氧化物酶，PBS 洗涤。用 5% 的正常羊血清封闭 20 min。免疫组化参照 Yan *et al*. (1999) 的方法，对照用标准的 IgG 代替一抗。本实验用碱性磷酸酶标记的二抗代替生物素标记的二抗，显色底物用 BCIP/NBT 代替 DAB，因而免疫组化的阳性信号为蓝色。

2 结 果

2.1 小鼠胎盘形成过程中 TGF－β mRNA 的表达

如图 1 所示,小鼠胎盘形成过程中 TGF－β mRNA 的表达有时间和空间特异性。在妊娠第 7.5～9.5 天,TGF－βmRNA 在蜕膜中表达,其中第 9.5 天表达最强;所产生的有生物活性的 TGF－β 参与对滋养层细胞侵入程度的控制。滋养层巨细胞在第 10.5 天表达 TGF－β mRNA,此时的滋养层巨细胞已经逐渐失去侵入能力,其功能向内分泌型转换。海绵滋养层从第 9.5 天开始表达 TGF－βmRNA,在第 11.5～12.5 天达到最强,之后仅个别海绵滋养层细胞团块继续表达。这些表达 TGF－β 的海绵滋养层细胞位于母胎界面胎儿侧,到第 11.5 天可见表达 TGF－β 的滋养层细胞围绕着胎儿新生血管。

2.2 小鼠胎盘形成过程中 TGF－β 抗原的表达

免疫组化结果显示 (图 2)，小鼠胎盘中 TGF－β 抗原的表达与 mRNA 的变化情况基本一致。妊娠第 7.5～9.5 天蜕膜表达 TGF－β 抗原，且表达逐渐增强。第 10.5 天，滋养层巨细胞表达 TGF－β 抗原。第 10.5～12.5 天海绵滋养层表达 TGF－β 抗原。与 mRNA 的表达相比，TGF－β 抗原的分布更为广泛。

3 讨 论

原位杂交和免疫组化的结果都显示,在妊娠第 7.5～9.5 天,TGF－β 主要在子宫蜕膜中表达,而且表达逐渐增强。这就说明,此时 TGF－β 的作用可能主要是控制滋养层细胞的侵入,因为 TGF－β 对 PA 和 MMP 两类主要的细胞外蛋白水解酶均有抑制作用,它促进 PAI－1 的表达从而抑制 uPA 活性(Graham *et al*.,1994);同时,TGF－β 还可以抑制 MMP－1、3、9 的表达(Delany & Brinckerhoff,1992),并诱导 TIMP－1 的表达(Graham & Lala,1991)。另外,TGF－β 还能诱导细胞表面整合素的改变(Ivring & Lala,1995)和滋养层细胞的分化(Graham *et al*.,1992),这些也影响着滋养层的侵入。

第 10.5 天时,滋养层巨细胞体积达到最大,

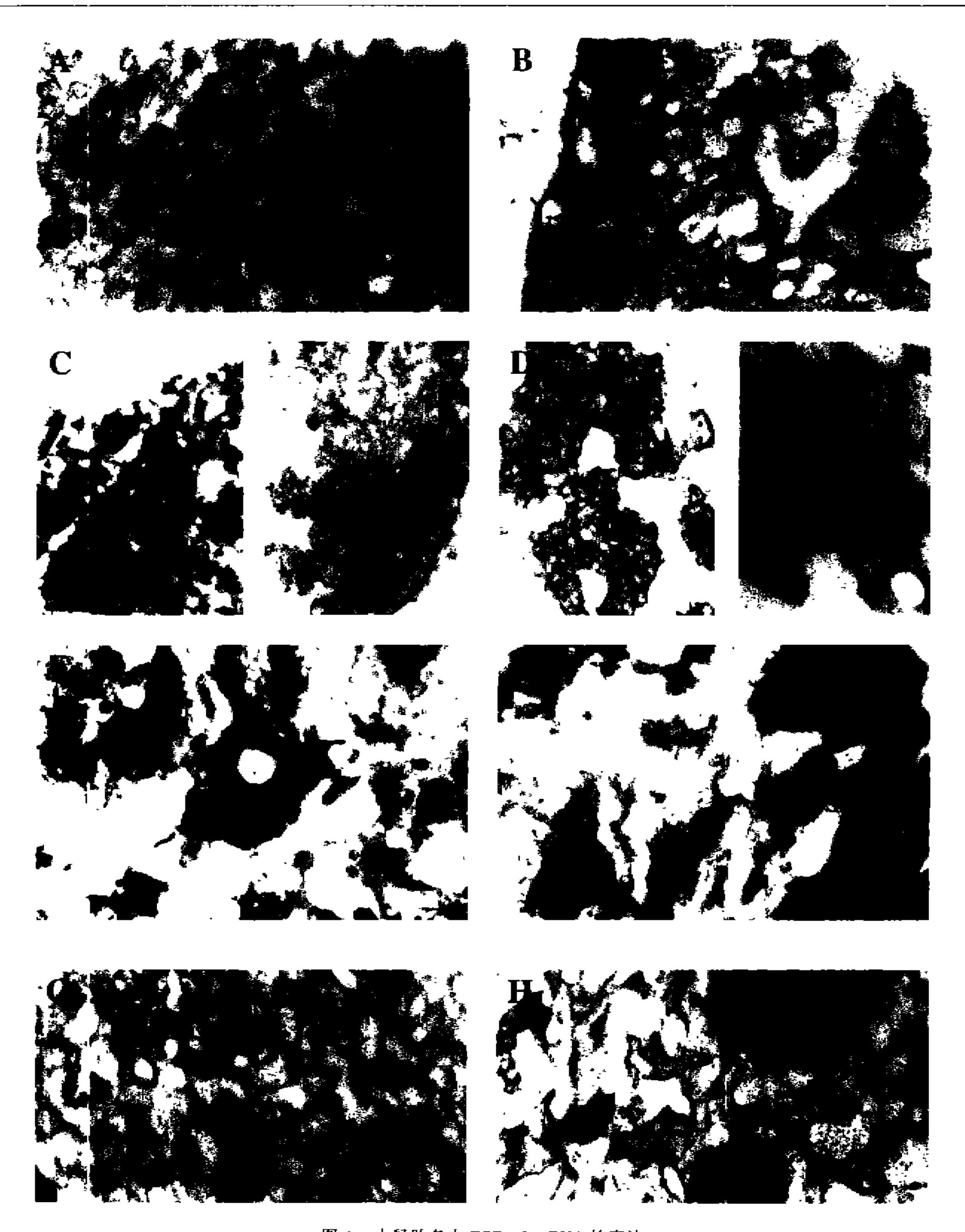


图 1　小鼠胎盘中 TGF－β mRNA 的表达

Fig.1　Localization of TGF-β mRNA in murine placenta

A.7.5 天（day 7.5）；B.8.5 天（day 8.5）；C.9.5 天（day 9.5）；D.10.5 天（day 10.5）；E.11.5 天（day 11.5）；F.12.5 天（day 12.5）；G.13.5 天（day 13.5）；H.14.5 天（day 14.5）。

de：蜕膜（deciduas），sp：海绵滋养层（spongiotrophoblast），gi：滋养层巨细胞（trophoblast giant cell）。各图均放大 200 倍（all photographs are shown at 200 ×）。

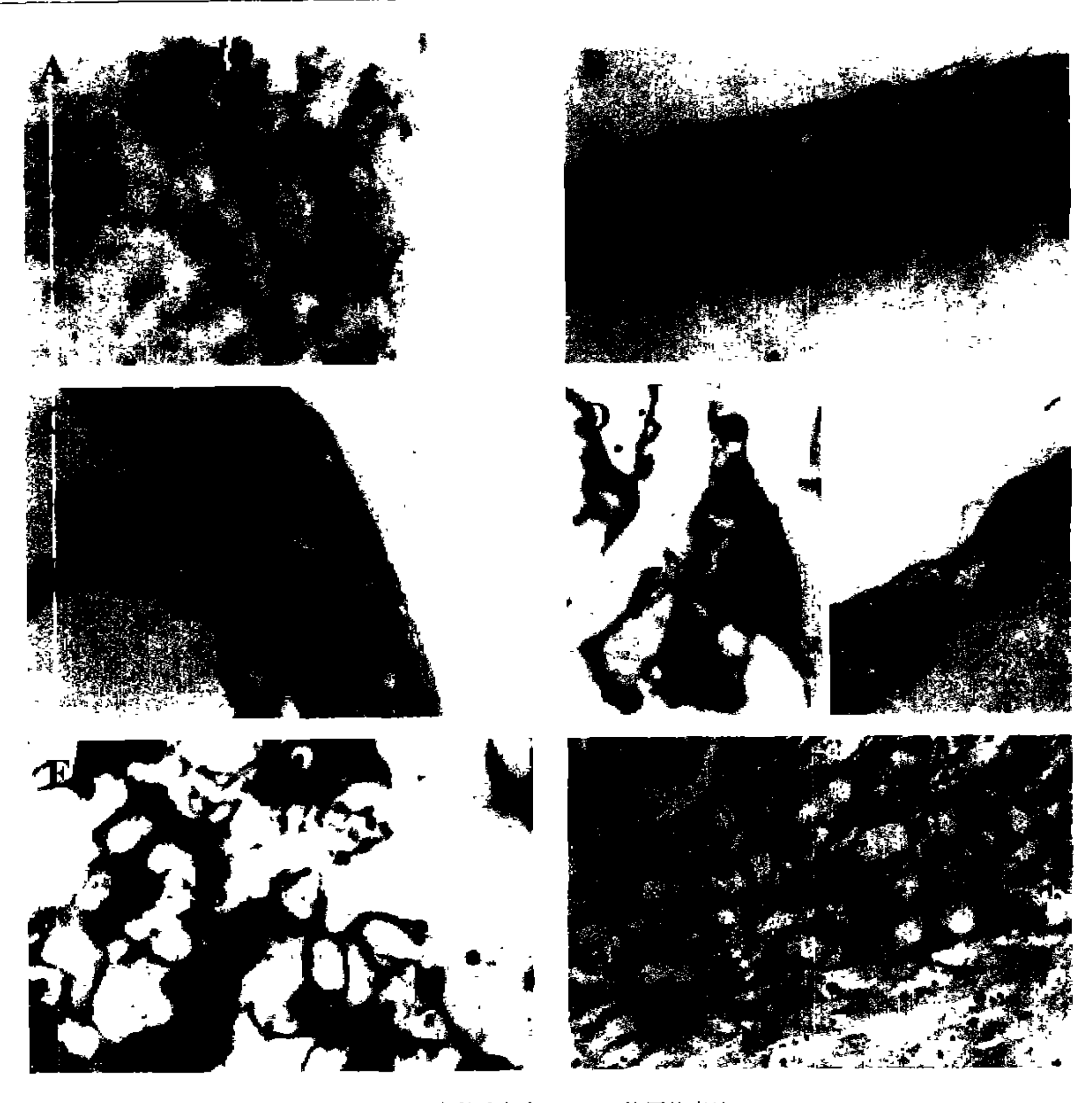


图 2 小鼠胎盘中 TGF－β抗原的表达

Fig.2 Localization of TGF-β antigen in murine placenta

A.7.5天（day 7.5）；B.8.5天（day 8.5）；C.9.5天（day 9.5）；D.10.5天（day 10.5）；E.12.5天（day 12.5）；F.13.5天（day 13.5）。

de：蜕膜（deciduas），sp：海绵滋养层（spongiotrophoblast），gi：滋养层巨细胞（trophoblast giant cell）。各图均放大200倍（all photographs are shown at 200×）。

且不再增殖（Muntener & Hsu，1977）；同时，其功能也从侵入型向内分泌型转换（Soares *et al.*，1996）。此时的滋养层巨细胞表达 TGF－βmRNA 和蛋白质，这与其功能的转换是一致的；因此，成熟的绒毛尿囊胎盘中的滋养层巨细胞不但自身失去侵入能力，而且还可能通过分泌 TGF－β控制母胎界面处海绵滋养层对蜕膜的侵入。

海绵滋养层细胞从第 9.5 天开始表达 TGF－βmRNA，而 TGF－β抗原从第 10.5 天开始出现（图1、2）。第 11.5～12.5 天，TGF－βmRNA 的表达达到最高，同时，TGF－β抗原的分布更加弥散，这提示海绵滋养层细胞来源的 TGF－β可能通过自分泌和旁分泌的方式发挥作用。另外，Sharma（1998）指出，小鼠妊娠后期滋养层细胞侵入能力明显降低，这可能是由于滋养层细胞分泌的 TGF－β负反馈介导的。TGF－β对血管发生有双重作用：低剂量的 TGF－β发挥正协同作用，促进血管内皮细胞的侵入和迁移，这可能是通过其激活素受体样

激酶－5（activin receptor-like kinase 5，ALK5）实现的；而高剂量的TGF－β则通过（ALK1）抑制内皮细胞的迁移，促进基膜的形成（Oh *et al*.，2000）。Pepper *et al*.（1990）发现bFGF能使血管内皮细胞中uPA/PAI－I的平衡偏向于uPA，诱导内皮细胞迁移和血管芽的形成；而TGF－β则使内皮细胞中uPA/PAI－I的平衡偏向PAI－1，进而诱导新生血管的定向生长并成熟。第9.5天之后，由尿囊中胚层来源的脐血管在绒毛板不断分枝并深入迷宫，形成大量胎儿毛细血管。同时，胎儿毛细血管内皮细胞与滋养层之间以及细胞滋养层与合胞体滋养层之间均有基膜存在。由图1E可见，第11.5天时，表达TGF－β mRNA的海绵滋养层细胞团块包绕着胎儿新生血管。这时胎儿血管内皮细胞一方面随着滋养层的侵入继续向前迁移；另一方面、已发芽的新生血管则定向生长并趋于成熟。因此，海绵滋养层表达的TGF－β对于胎儿血管发生究竟产生何种作用，仍需进一步验证。我们推测，由于表达TGF－β的海绵滋养层细胞位于母胎界面胎儿侧，因此这里较高的TGF－β浓度可能有利于已发芽血管的定向生长和成熟；而以旁分泌方式扩散至母胎界面处的TGF－β浓度较低，有利于诱导内皮细胞向前迁移。TGF－β通过调节细胞分化、侵入和血管发生影响胎盘的形成（Morrish *et al*.，1998）。

另外，TGF－β对免疫系统有强烈的抑制作用（de Visser & Kast，1999）。肿瘤细胞通过分泌TGF－β可以阻断激活的淋巴细胞增殖，并防止自身被细胞毒T淋巴细胞和NK细胞裂解（Fakhrai *et al*.，1996；Tada *et al*.，1991）。围植入期的滋养层细胞无免疫原性，但在随后的胎盘形成过程中，MHC I型抗原重新出现在海绵滋养层和迷宫滋养层（Lala *et al*.，1984）。肿瘤和胚胎在体内均可逃避免疫系统的监控，因此妊娠中后期海绵滋养层细胞可能通过大量表达TGF－β以调节局部免疫，避免对胎儿的排斥反应发生。

总之，在小鼠胎盘形成中后期，TGF－βmRNA和蛋白质在蜕膜和滋养层中的特异表达显示：TGF－β可能参与调控滋养层细胞的侵入和诱导胎儿绒毛血管的定向生长和成熟，另外，TGF－β可能使胚胎免受母体免疫系统的排斥。但是，关于TGF－β在胚胎着床过程中的作用，还需要深入研究。

参 考 文 献

Assosian R K, Sporn M B, 1986. Type β transforming growth factor in human platelets: release during platelet degranulating and action on vascular smooth muscle cells[J]. *J. Cell Biol*., **102**: 1217－1223.

de Visser K E, Kast W M, 1999. Effects of TGF-β on the immune system: implication for cancer immunotherapy[J]. *Leukemia*, **13**: 1199.

Delany A M, Brinckerhoff C E, 1992. Post-transcriptional regulation of collagenase and stromelysin gene expression by epidermal growth factor and dexamethason in cultured human trophoblasts[J]. *J. Cell Biochem*., **50**: 400－410.

Dungy L J, Siddiqi T A, Khan S, 1991. C-jun and jun B oncogene expression during placental development[J]. *Am. J. Obstet. Gynecol*., **165**: 1853－1856.

Fakhrai H, Dorigo O, Shawler D L *et al*, 1996. Eradication of established intracranial rat gliomas by transforming growth factor β antisense therapy[J]. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**: 2909－2914.

Graham C H, Lala P K, 1991. echanism of control of trophoblast invasion *in situ*[J]. *J. Cell Physiol*., **148**: 228－234.

Graham C H, Lysiak J J, McCrae K R *et al*, 1992. Localization of transforming growth factor β at the human fetal-maternal interface: role in trophoblast growth and differentiation[J]. *Biol. Reprod*., **46**: 561－572.

Graham C H, Connelly I, MacDougall *et al*, 1994. Resistance of malignant trophoblast cells to both the anti-proliferative and anti-invasive effects of transforming growth factor-β[J]. *Exp. Cell Res*., **214**: 93－99.

Irving J A, Lala P K, 1995. Functional role of cell surface integrins on human trophoblast cell migration: regulation by TGF-β, IGF-Ⅱ and IGFBP-1[J]. *Exp. Cell Res*., **217**: 419－427.

Lala P K, Kearns M, Colavincenzo V, 1984. Cells of the fetomaternal interface: their role in the maintenance of viviparous pregnancy[J]. *Am. J. Anat*., **170**: 501－517.

Lawrence D A, 1996. Transforming growth factor-β: a general review[J]. *Eur. Cytokine Netw*., **7**: 363－374

Liu K, Wahlberg P, Ny T, 1998. Coordinated and cell-specific regulation of membrane type matrix metalloproteinases 1 (MT1-MMP) and its substrate matrix metalloproteinases 2 (MMP-2) by physiological signals during follicular development and ovulation[J]. *Endocrinology*, **139**(11): 4735－4738.

Markowitz S D, Roberts A B, 1996. Tumor suppressor activity of the TGF-beta pathway in human cancers[J]. *Cytokine Growth Factor Rev*., **7**: 93－102.

Massague J, 1990. The transforming growth factor-β family[J]. *Annu. Rev. Cell Biol*., **6**: 597－641.

Michael R, 1999. TGF-β and cancer[J]. *Microbes and Infection*, **1**: 1327－1347.

Montuenga L M, Mariano J M, Prentice M A *et al*, 1998. Coordinate expression of transforming growth factor-beta 1 and adrenomedullin in rodent embryogenesis[J]. *Endocrinology*, **139**: 3946－3957

Morrish D W, Dakour J, Li H, 1998. Functional regulation of human trophoblast differentiation[J]. *J. Reprod. Immun*., **39**: 179－195.

Moses H L, Serra R, 1996. Regulation of differentiation by TGF-β[J]. *Curr. Opin. Genet. Dev*., **6**: 581－586.

Muntener M, Hsu Y C, 1977. Development of trophoblast and placenta of

the mouse[J]. *Acta Anat*., **98**: 241 - 252.
Oh S P, Seki T, Goss K A *et al*, 2000. Activing receptor-like kinase 1 modulates transforming growth factor-β1 signaling in the regulation of angiogenesis [J]. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**: 2626 - 2631.
Pepper M S, Belin D, Montesano R *et al*, 1990. Transforming growth factor-beta 1 modulates basic fibroblast growth factor-induced proteolytic and angiogenesis properties of endothelial cells *in vitro* [J]. *J. Cell Biol*., **111**: 743 - 755.
Peter K, Graham B, 1994. Anatomy and genetics of the placenta[A]. In: Knobil E, Neill J D. The Physiology of Reproduction. 2nd [M]. New York: Raven Press. 441 - 484.
Roberts A B, Sporn M B, 1993. Physiological actions and clinical application of transforming growth factor-beta (TGF-beta)[J]. *Growth Factor*, **8**: 1 - 9.
Schaeren W N, Gerfin M A, 1993. A single protocol to detect transcripts of various types and expression levels in neutral tissue and cultured cells: *in situ* hybridization using digoxingenin-labelled cRNA probes [J]. *Histochem*., **100**: 431 - 440.
Sharma R K, 1998. Mouse trophoblastic cell lines: Relationship between invasive potential and TGF-beta 1[J]. *In Vivo*, **12**: 431 - 440.
Slager H G, Lawson K A, van den Eijnden-van Raaij A J *et al*, 1991. Differential localization of TGF-beta 2 in mouse preimplantation and early postimplantation development[J]. *Dev. Biol*., **145**: 205 - 218.
Soares M J, Chapman B M, Rasmussen C A *et al*, 1996. Differentiation of trophoblast endocrine cells[J]. *Placenta*, **17**: 277 - 289
Tada T, Ohzeki S, Utsumi K *et al*, 1991. Transforming growth factor-beta-induced inhibition of T cell function: Susceptibility difference in T cell of various phenotypes and functions and its relevance to immunosuppression in the tumor-bearing state[J]. *J. Immunol*., **146**: 1077 - 1082.
Wahl S M, 1994. Transforming growth factor β: the good, the bad, and the ugly[J]. *J. Exper. Med*., **180**: 1587 - 1590
Yan J L, Feng Q, Liu H Z *et al*, 1999. Expression of tPA, LH receptor and inhibin α, $β_A$ subunits during follicular atresia in rats[J]. *Science in China*, **42**(6): 583 - 590.

Expression of TGF-β in the Mouse Placenta

GAO Fei MA Jie FU Guo-Qiang WEI Peng FENG Qiang LIU Yi-Xun
(*State Key Laboratory of Reproductive Biology, Institute of Zoology, the Chinese Academy of Sciences, Beijing* 100080, *China*)

Abstract: Expression of TGF-β mRNA and protein in mouse placenta was detected using *in situ* hybridization and immunohistochemistry. The results showed that TGF-β mRNA and protein were mainly detected in the deciduas between D7.5 and D9.5 of pregnancy and the expression gradually decreased. The data indicate that TGF-β might be involved in regulation of trophoblast invasion during this period and may act through inhibiting the activity of two types of extracellular proteinase, PAs and MMPs. On D10.5 of pregnancy, trophoblast giant cells expressed TGF-β mRNA and protein. This was consistent with the fact that the trophoblast giant cells stoped to proliferate and invade at this time. On D9.5, spongiotrophoblast cells began to express TGF-β mRNA, while its protein was detected in these cells on D10.5, and the expression of TGF-β mRNA reached the peak level between D11.5 and D12.5 indicating it maybe also involved in regulation of the formation of fetal vasculature during this period. Furthermore, the maternal tolerance to fetal semi-allograft was partly attributed to the expression of TGF-β, because TGF-β could inhibit the maternal immune system.

Key words: Transforming growth factor-β (TGF-β); Mouse; Placenta; Trophoblast cell; Spongiotrophoblast cell; Trophoblast giant cell